

Quinolonas

GONZÁLEZ CABEZA, José
Docente UCV Escuela de Medicina

Leshner en 1962 durante el proceso de purificación de la cloroquina descubrió de modo fortuito el ácido nalidíxico, el cual fue destinado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario; a partir de éste, han surgido un conjunto de compuestos análogos con actividad antibacteriana, también llamados quinolonas, 4-quinolonas, carboxiquinolonas o ácidos quinolona carboxílico (Wolfson y Hooper, 1989; Drlica y Zhao, 1997). La plasticidad del grupo químico central ha permitido la síntesis y ensayo de miles de moléculas distintas de estos compuestos.

1. ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura química básica con propiedades farmacológicas (o farmacóforo) que es común a todas estas moléculas es el anillo piridona, con un sustituyente carboxilado en posición 3; mientras que el núcleo central de la molécula de quinolona es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, del cual derivan las quinolonas fluoradas y no fluoradas (Wolfson y Hooper, 1989), (Figura 1).

Los estudios químicos revelan que resulta esencial el N-1 del anillo de piridona en la actividad de la molécula, no pudiendo ser reemplazado; mientras que el C-2 admite pocas variaciones. El C-3 sólo puede ser reemplazado por un anillo tiazolidona fusionado con el C-2; mientras que se tiene poca información sobre variaciones en C-4 (Chu y Fernández, 1989).

El otro componente de la molécula es generalmente un anillo aromático (auxofarmacóforo) con diferentes sustituyentes y que le confiere las características farmacológicas y farmacocinéticas (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

2. CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

En 1997 se propuso una nueva clasificación de quinolonas que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Convencionalmente han sido agrupadas por generaciones relacionadas con su época de aparición, estructura química y sobre todo con el espectro antibacteriano. En la Tabla 1 se resume de modo concreto estas características.

2.1. Quinolonas de primera generación

Esta primera generación (Tabla 1) se caracterizó por presentar un reducido espectro de actividad antimicrobiana, sólo fue útil frente a ciertas especies de enterobacterias, y no sobre otras especies de relevancia

clínica, como *Pseudomonas*, cocos Gram positivos y anaerobios; razón por la cual, tuvo una aplicación limitada sólo en el tratamiento de infecciones de las vías urinarias, (King, *et al.* 2000). Éstas fueron empleadas hasta finales de los años 1970 (King, *et al.* 2000).

Este primer grupo está representado por el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina, pipemidina y otras que se muestran en la Figura 2 (King *et al.* 2000), Un caso particular lo constituye la flumequina que posee un átomo de flúor; sin embargo, varios autores han creído conveniente incluirla dentro de esta categoría por sus cualidades farmacológicas (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

2.2. Quinolonas de segunda generación

Una década posterior al descubrimiento del ácido nalidíxico, apareció un nuevo grupo, las fluoroquinolonas (FQ); sintetizándose un número mayor de ellas, entre las que se incluye la norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, fleroxacin, tomafloxacina, lomefloxacina (también clasificada como quinolona de tercera generación), difloxacina y muchas otras (King, *et al.* 2000). La estructura molecular de algunas de ellas se representa en la Figura 3. Este grupo fue empleado durante las décadas 1980 y 1990, llegándose a afirmar que han sido probablemente los antimicrobianos más importantes en la quimioterapia antibacteriana durante dicho período. Estructuralmente difieren de sus anteriores análogos (ácido nalidíxico, ácido oxalínico y cinoxacina) principalmente en dos aspectos. El primero de ellos, es la presencia de un átomo de flúor en posición 6, el cual permite aumentar tanto la afinidad por sus blancos (topoisomerasas tipo II), como la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana (hasta setenta veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esa posición (Sumano, 1993); y el segundo, es que poseen un sustituyente piperazinil o pirrolidinil (diamida cíclica) en posición 7 del núcleo quinolónico (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

Clínicamente presentan un amplio espectro antimicrobiano, mayor potencia, una disminuida selección de bacterias resistentes, inmejorables propiedades farmacocinéticas, ser menos tóxicas, y tener escasos efectos secundarios. Este grupo presenta actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y determinadas especies de micobacterias, clamidias, y rickettsias; permitiendo así el tratamiento de infecciones sistémicas (Tabla 1). Sin embargo, su actividad frente a

Acinetobacter y *S. maltophilia* es moderada y escasa frente a *S. pneumoniae* y a otras especies de *Streptococcus* (King, *et al.* 2000).

2.3. Quinolonas de tercera generación

Las quinolonas de la tercera generación, como esparfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin y grepafloxacin se caracterizan por presentar una mayor complejidad estructural que sus predecesores, por contener sustituyentes fluorados adicionales y otros cambios en posiciones 1, 7 y 8 (Figura 4), mejorando algunas propiedades farmacocinéticas y de espectro antimicrobiano frente a sus análogos de la segunda generación y presentando una mayor actividad ante cocos Gram positivos (Tabla 1) (King, *et al.* 2000).

Algunas de ellas han sido retiradas del mercado después de aprobada su comercialización o se ha restringido su uso por sus efectos tóxicos (esparfloxacin, grepafloxacin) (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

2.4. Quinolonas de cuarta generación

En la actualidad, se vienen sintetizando nuevos compuestos derivados de los señalados anteriormente (Tabla 1) que poseen nuevas propiedades; como la de presentar actividad sobre anaerobios (*Clostridium*, *bacteroides*), abriendo la posibilidad de su uso en infecciones mixtas (King, *et al.* 2000). Por otro lado, algunas de ellas poseen actividad antitumoral, según se ha demostrado en animales de experimentación, lo cual posibilita su futura aplicación en el tratamiento de ciertos procesos tumorales (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

Aún así, estos compuestos siguen siendo polémicos y motivo de una intensa investigación, tanto por lo que se refiere a su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como porque actúan sobre dianas de procariontes y eucariotas. Entre los representantes de este grupo, se señala a la clinafloxacin, trovafloxacin (retirada del mercado), difloxacin, gemifloxacin, sitafloxacin y tosufloxacin (Figura 5).

Por otra parte, la posibilidad de lograr una mejor actividad a partir de nuevas modificaciones de la estructura no está cerrada, como lo demuestra el desarrollo de las 6-desfluoroquinolonas, las cuales carecen del átomo de flúor en posición 6, el cual se había venido considerando imprescindible para un grado suficiente de actividad. El desarrollo de diversas moléculas dentro de este grupo (garenoxacino y PGE 9262932, entre otras), con una elevada afinidad por las topoisomerasas se encuentra en fase más o menos avanzada y se asocia a un aumento de actividad *in vitro*, un espectro muy amplio y un reducido potencial de selección de resistencias (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).

Desde el punto de vista de la actividad intrínseca, otro ámbito en el que se viene trabajando es sobre los Gram negativos. Las nuevas moléculas desarrolladas mejoran discretamente, en el mejor de los casos, su actividad frente a enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores; aunque de hecho la ciprofloxacina, sigue considerándose la fluoroquinolona de elección frente a *P. aeruginosa*. Conseguir moléculas que además de ser eficaces en Gram positivos, incrementen de forma significativa su actividad frente a Gram negativos, es otro de los objetivos deseables (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).

3. MECANISMOS DE ACCION DE LAS QUINOLONAS

En el año 1977 se demostró en *E. coli*, que el ácido nalidíxico inhibía específicamente la DNA girasa, de lo que se

dedujo que esta era su diana primaria y funcional. Hoy en día se conoce un amplio rango de especies bacterianas que de igual modo tienen por diana la DNA girasa (Yoshida, *et al.* 1993). Aunque es preciso señalar que también inhiben las actividades de la topoisomerasa IV, cuyas funciones *in vivo* son aún poco conocidas (Wolfson y Hooper, 1989). De modo general, se puede afirmar que la acción de las quinolonas consiste en inhibir la DNA girasa y la topoisomerasa IV (topoisomerasas tipo II) (Drlica y Zhao, 1997; Bearden y Danziger, 2001).

3.1. DNA girasa

Durante el intento de establecer los factores involucrados en la integración del fago en el cromosoma de *E. coli*, Gellert y *col.* (1976) descubrieron una enzima que era dependiente de ATP y capaz de introducir superenrollamientos negativos en el DNA, la cual fue denominada DNA girasa (Reece y Maxwell, 1991).

La DNA girasa es una enzima formada por cuatro subunidades: dos subunidades GyrA de 97 kDa cada una, codificadas en el gen *gyrA* (2625 pb), y dos subunidades GyrB de 90 kDa cada una, codificadas en el gen *gyrB* (2413 pb), estando ubicados ambos genes en el minuto 48 y 83, respectivamente del cromosoma de *E. coli* K-12 (Reece y Maxwell, 1991). La masa molecular de la holoenzima es de 374 kDa, formando una partícula globular de 120150 Å (Reece y Maxwell, 1991) que presenta actividad "DNA - cleavage" (Wolfson y Hooper, 1989; Reece y Maxwell, 1991).

Se requieren ambas subunidades para la plena actividad de la DNA girasa. La subunidad GyrA se une al DNA (en ausencia de la subunidad B), interviene en el corte y unión del DNA a través de la Tyr¹²², formando un enlace transitorio con el DNA cerrado; mientras que la subunidad GyrB posee actividad ATPasa, la cual se ve estimulada por la subunidad A. Cada monómero GyrA presenta una cabeza amino terminal y una cola carboxi proximal. La proteína GyrA es de tipo "hélice giro-hélice" (HTH), compuesta por las hebras α y β , y adopta diferentes topologías para permitir la apertura y el cierre a través del cual debe pasar el DNA (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

La DNA girasa es una enzima esencial para la viabilidad celular, estando involucrada en diversos procesos celulares, (Tabla 2) (Reece y Maxwell, 1991; Aleixandre, *et al.* 1991; Khodursky, *et al.* 2000; Hooper, 2001). Su principal función consiste en catalizar el superenrollamiento negativo del DNA circular de la bacteria, que es el estado natural en que se encuentra el cromosoma bacteriano; considerando que el DNA debe de situarse en un espacio limitado al interior de la célula, dispuesto en unos 50-80 zonas especialmente organizadas a las que Worcel denominó "enrollamientos" o "dominios" adosados a un núcleo central de RNA y que a la vez estos dominios se hallan formando unos 400 "dominios de superenrollamiento", cuyas espirales están dispuestas en sentido contrario a la hélice de DNA. (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

In vitro, la DNA girasa introduce tales superenrollamientos negativos en el DNA y forma y resuelve nudos en el dúplex de DNA. Todas estas reacciones son dependientes de ATP y requieren un catión divalente, óptimamente Mg²⁺ (Reece y Maxwell, 1991), aunque puede ser sustituido por Mn²⁺. *In vitro*, también puede eliminar los superenrollamientos positivos (Reece y Maxwell, 1991) en presencia de un análogo no hidrolizable de ATP (5'-adenilil - , - imidodifosfato (ADPNP)) (Wolfson y Hooper, 1989; Reece y Maxwell, 1991). En ausencia de ATP son eliminados los superenrollamientos negativos. El cociente ATP / ADP determina el grado final de superenrollamiento, por lo que sería un mecanismo homeostático para controlar el superenrollamiento (Drlica y Zhao, 1997). Esto hace

pensar que el enrollamiento puede ser sensible a los cambios energéticos intracelulares y, a la vez, a ciertos parámetros del entorno extracelular, como la concentración de sales, tensión de oxígeno y temperatura; pero no está claro si éstos son efectores directos de la relación ATP/ADP (Drlica y Zhao, 1997).

El proceso de superenrollamiento negativo se realiza en varias etapas. El primer paso es la interacción DNA girasa dsDNA, en la que están involucradas de 120-150 pb (Reece y Maxwell, 1991). Seguidamente, la DNA girasa rompe el DNA y se une covalentemente de forma transitoria a los extremos 5' libres del DNA por medio de la Tyr¹²² de la subunidad GyrA. El DNA pasa a través del punto de rotura, lo cual permite que el número de enlace se reduzca en 2. Por último, la rotura del DNA es sellada y la DNA girasa se disocia, lo cual esto está condicionado posiblemente por la hidrólisis de dos moléculas de ATP y, de las dos subunidades GyrB que producirían un cambio conformacional de la enzima (Reece y Maxwell, 1991).

A excepción de los procesos integrativos de ciertos fagos o la transposición de ciertos transposones, las quinolonas inhiben todas las actividades *in vitro* de la DNA girasa y demás reacciones catalizadas por esta enzima en las células bacterianas (Drlica y Zhao, 1997).

Mutaciones en *gyrA* confieren resistencia a estos compuestos, habiéndose demostrado que la unión de la quinolona es posterior a la ruptura del DNA, debida a la actividad de la DNA girasa; de este modo se impide el giro de la enzima (Reece y Maxwell, 1991). Debido a ello; es que siempre se ha postulado que la DNA girasa es la diana funcional y los monómeros GyrA las dianas primarias, aunque en la actualidad y debido al aislamiento de mutantes *gyrB* resistentes a las quinolonas, se ha cuestionado que la subunidad GyrA sea la única diana primaria de unión de las quinolonas (Wolfson y Hooper, 1989; Drlica y Zhao, 1997; Hooper, 2001).

3.2. Modelos sobre los mecanismos moleculares de acción de las Quinolonas

Los primeros estudios señalaron que las quinolonas (ácido nalidíxico) eran incapaces de unirse al DNA, y no fue hasta 1985 que Shen propuso que la norfloxacin se unía al DNA y no directamente a la DNA girasa y que su grado de unión dependía de la topología del DNA. Esta propuesta comportó numerosos trabajos que condujeron a elucidar cual es la diana primaria de estos compuestos: el DNA o la DNA girasa. Actualmente existe el consenso de aceptar que la diana funcional es la DNA girasa y que estos compuestos deben formar una interacción estable con el complejo DNA girasa DNA para inhibir la actividad de la enzima.

El modelo propuesto por Shen y col. se denominó "unión cooperativa quinolona DNA" (Figura 6A), el cual propone una inhibición de la DNA girasa de modo indirecto. El principio se sustenta en la generación de un lugar de unión de la quinolona al DNA relajado de cadena sencilla (ssDNA), producto de la rotura del DNA por acción de la enzima. Este corte produciría un desapareamiento de 4 pb, lugar óptimo para la unión de las moléculas de quinolonas a las bases del DNA a través de puentes de hidrógeno, y dichas moléculas se unirían cooperativamente entre sí por un proceso de autoensamblaje (Shen, *et al.* 1989).

Estudios sobre la estructura cristalina del ácido nalidíxico proponen dos posibles tipos de interacción entre las moléculas de quinolonas. Por un lado, posibles interacciones hidrofóbicas cola con cola entre grupos laterales de N-1 y apilamientos - entre los anillos de quinolonas. Estas interacciones dan lugar a un complejo supramolecular que formaría una unidad consolidada y saturaría el espacio abierto en la molécula de DNA por la

DNA girasa, cancelando así los eventos posteriores del proceso del superenrollamiento catalizados por esta enzima.

Este modelo, donde la diana primaria es el DNA, parte de los supuestos siguientes: *i*) la topología del lugar de unión generado por la DNA girasa, y *ii*) la capacidad de las moléculas de quinolonas de autoensamblarse y ocupar tales lugares. En esta propuesta se establecen diferentes dominios funcionales en la molécula de quinolona (Figura 6B): una región de unión al DNA a través de puentes de hidrógeno, una región lipofílica que permitiría la autoasociación de las moléculas de quinolonas y otra región de interacción con la DNA girasa, sugiriéndose que los sustituyentes en el C-7 de la molécula de quinolona podría interaccionar con GyrB de la enzima (Shen, *et al.* 1989).

Este concepto de unión quinolonaDNA ha sido ampliado, como fruto de diferentes observaciones sobre la posible modulación del proceso de unión, proponiéndose que las quinolonas no se unen al DNA a través de puentes de hidrógeno, sino a través de Mg²⁺, entre sus mitades carbonil y carboxil y los grupos fosfato del DNA, y que no hay autoasociación entre moléculas de quinolonas. Además, las bases de la región de ssDNA interaccionan con el sistema planar del anillo de la molécula de quinolona, lo cual estabilizaría el complejo formado. También se ha sugerido que los sustituyentes en el C-7 y en el N-1 podrían estar implicados en la unión de la quinolona a la DNA girasa (Figura 7).

Los dos modelos comentados anteriormente parten de la premisa de que el DNA es la diana primaria de unión de las quinolonas, no obstante no existe un acuerdo general.

Maxwell y col. han propuesto un modelo alternativo (Maxwell, 1992), en el cual la DNA girasa es la diana primaria de las quinolonas, postulando que se requiere tanto la DNA girasa como DNA para que las quinolonas interaccionen de forma estable, sustentándose en que la mayoría de mutantes de resistencia presentan cambios en la denominada "Región Determinante de Resistencia a Quinolonas" (QRDR, del inglés "Quinolone Resistance Determining Region") del gen *gyrA*, lo cual provoca una drástica reducción de la unión de la quinolona (norfloxacin) al complejo DNA girasaDNA. Además, sugieren que los grupos carboxil del C-3 y oxo del C-4 de las quinolonas se unen por puentes de hidrógeno a las QRDR de la enzima. No obstante otros autores no descartan la participación de ciertos residuos de dicha región como el residuo Asp⁸⁷ (Palumbo, *et al.* 1993; Vila, *et al.* 1994; Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

Debido a todo lo expuesto, Shen acepta actualmente que el magnesio tendría algún rol en la unión de las quinolonas al DNA y que su modelo no está en contradicción con el hecho de la aparición de cepas resistentes a las quinolonas que presentan mutaciones en los genes *gyrA* o *gyrB*.

Otro modelo es el propuesto por Yoshida y col. en 1993 ("quinolone pocket model"), el cual sostiene que las quinolonas interaccionan en la hendidura formada por el complejo DNA girasa DNA durante el corte y unión del DNA. La unión estaría determinada conjuntamente por las subunidades GyrA y GyrB y muy posiblemente también por los iones Mg²⁺. Este modelo está más acorde con las hipótesis de unión quinolona DNA girasa, que con los modelos de unión quinolona DNA.

3.3. Otros efectos de las quinolonas

La rápida muerte celular que producen las quinolonas, conduce a pensar que dicha muerte sería una consecuencia directa de la inhibición de la DNA girasa. Sin embargo, es complicado discriminar si esta inhibición es directamente responsable de la muerte celular y/o si la inhibición de la DNA girasa es un evento inicial y necesario

que desencadena una cascada de procesos que conducen finalmente a la muerte de la célula (Drlica y Zhao, 1997). Investigaciones *in vitro* e *in vivo* revelan que la concentración de quinolona, requerida para inhibir el superenrollamiento del DNA, es de 10 a 100 veces superior de la que se necesita para inhibir el crecimiento celular. Por ello se supone que no es necesaria una total inhibición de las actividades de la DNA girasa para que se produzca la muerte celular (Hallet y Maxwell, 1991; Drlica y Zhao, 1997). Kreuzer y Cozzarelli propusieron en 1979 la "hipótesis del veneno"; la cual sugiere que la interacción de las quinolonas con la DNA girasa se convierte en un veneno celular, postulando que dicho veneno sería el complejo quinolona-DNA girasa-DNA (Piddock, *et al.* 1992; Khoudarsky y Kozzarelli, 1998) que actuaría de barrera al paso de las polimerasas, impidiendo así los procesos de replicación y transcripción.

Las quinolonas ejercen una rápida inhibición de la síntesis del DNA. Este efecto por sí sólo no parece ser suficiente para ocasionar la muerte celular, debiendo existir algún otro evento que requeriría síntesis proteica para que ocurra la muerte de la célula. En este sentido, se ha demostrado que tratamientos que inhiben la transcripción y la traducción o la privación de aminoácidos produce una disminución de la actividad bacteriaca de las quinolonas sin afectar a la inhibición de la síntesis de DNA (Khodursky, *et al.* 2000).

Atendiendo a los factores fisiológicos que se requieren para que las quinolonas ejerzan su acción bactericida, se han descrito varios mecanismos de acción, los cuales varían según la quinolona y el microorganismo estudiado. El Mecanismo A, común a todas las quinolonas, requiere que la bacteria esté en fase de crecimiento y que presente síntesis de proteínas y RNA. Este mecanismo es el único que se ha observado con las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, y ácido oxolínico). El Mecanismo B no requiere que se produzca síntesis de proteínas o RNA para ejercer su acción bactericida, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando. Por último, el Mecanismo C requiere que haya síntesis de proteínas y RNA para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando. (Clerch, 1995; Tálens-Visconti, 2002).

Otro de los efectos de las quinolonas es su posible acción sobre las superficies celulares. Se ha reportado que concentraciones subletales de quinolonas dan lugar a una distribución irregular de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae*, disminuyendo la síntesis del polisacárido capsular K1. Ello podría deberse a una acción directa de las quinolonas o ser una consecuencia de la inhibición de la DNA girasa por alteración de la transcripción de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de la cápsula (Drlica, y Zhao, 1997).

En estudios con plásmidos se ha detectado que dosis subinhibitorias de quinolonas conducen a la pérdida de los mismos, habiéndose sugerido que los mecanismos de replicación o de segregación de dichos plásmidos deben ser más sensibles a la acción de las quinolonas que los del cromosoma bacteriano (Reece y Maxwell, 1991).

También se ha descrito que estos compuestos inhiben la conjugación bacteriana y la transferencia del cromosoma bacteriano, estimulan la recombinación no homóloga y aumentan la producción de deleciones en ciertas regiones del plásmido pBR322 integrado en el cromosoma bacteriano (Hooper y Wolfson, 1993).

4. RESISTENCIA BACTERIANA A LAS QUINOLONAS

El empleo de las fluoroquinolonas se ha incrementado notablemente en los últimos años, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. Este hecho ha conllevado la

aparición de cepas resistentes. Por ello y por su clara aplicación terapéutica es importante el estudio de los mecanismos bacterianos de resistencia, con el objetivo de disponer de procedimientos clínicos adecuados y de diseñar estrategias que minimicen al máximo la resistencia bacteriana emergente. Bajo este contexto, debe valorarse la entrada del compuesto al citoplasma bacteriano, su integración al complejo topoisomerasa-DNA, efectos citotóxicos y finalmente la muerte celular (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Zhao, *et al.* 1997; Castro *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001).

La mayoría de las nuevas quinolonas van dirigidas al tratamiento de infecciones respiratorias, por lo que cabe esperar un aumento adicional de su consumo en los próximos años. Al principio de la introducción de las fluoroquinolonas, se pensó que la aparición y diseminación de resistencia sería rara, dada la dificultad de obtener *in vitro* mutantes de *E. coli* resistentes a las fluoroquinolonas tras muchos años de la utilización clínica del ácido nalidíxico o por la ausencia de plásmidos de resistencia a las quinolonas (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Kojima, 1997; Zhao, *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001). Sin embargo, la resistencia a las fluoroquinolonas mediada por mutaciones cromosómicas que producen alteraciones en las dianas (topoisomerasas) apareció rápidamente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; en éstas últimas, lo desarrollaron más rápidamente aquellas que presentaban resistencia a la metilicina, posiblemente debido a una transmisión nosocomial o a la posible co-selección con otros antimicrobianos (Pascual 2003).

Posteriormente, han aparecido cepas de enterobacterias, como *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, resistentes a las fluoroquinolonas, debido fundamentalmente a múltiples mutaciones que disminuyen la afinidad de las dianas por estos compuestos (Fischer, *et al.* 1989; Wolfson y Hooper, 1989; Zhao, *et al.* 1997; Bearden y Danziger, 2001; Pascual, 2003). En el caso de *C. jejuni*, la resistencia en humanos ha aumentado paralelamente a la resistencia en animales, tras la introducción de las fluoroquinolonas para uso humano y animal. La tasa de resistencia de este microorganismo para la ciprofloxacina en 2002 fue del 82% (Pascual, 2003). Para *E. coli*, la resistencia a las fluoroquinolonas en España, aparece especialmente en pacientes con infecciones del tracto urinario y pacientes neutropénicos con bacteriemia desarrollada durante la profilaxis. Además, la tasa de resistencia a la ciprofloxacina ha aumentado en España de un 4,3% en 1992 al 35% en 2002. Por otro lado, la tasa de portadores fecales de *E. coli* resistentes a las fluoroquinolonas es elevada, incluso en niños que no han estado en contacto con fluoroquinolonas (Pascual, 2003).

La introducción de fluoroquinolonas en los protocolos de tratamientos de infecciones respiratorias, como consecuencia del incremento de resistencia de *S. pneumoniae* a los betalactámicos y otros antimicrobianos, puede producir un aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas en este microorganismo, como de hecho se está empezando a describir, por lo que será importante hacer un seguimiento cercano a este posible efecto.

El comportamiento de una fluoroquinolona en relación con la aparición de resistencia, sería la de una fluoroquinolona con una baja capacidad de selección de resistencia y una farmacocinética que le permita mantenerse de forma estable a concentraciones séricas ampliamente superiores a las CMI de los mutantes que pudieran generarse. Desde este punto de vista, es interesante la descripción de algunas nuevas moléculas como DQ113, con una capacidad de selección de resistencia en estafilococos muy inferior a la de otras fluoroquinolonas, WCK771A que presenta una CMI < 1 mg/l frente a estafilococos resistentes a moxifloxacina y levofloxacina o DK 507k activa frente al 100% de los neumococos resistentes a levofloxacina (García Rodríguez y Muñoz Bellido, 2003).

4.1. Alteraciones en las dianas

Se dispone de suficiente información para sostener que la

causa principal de resistencia de *Escherichia coli* a las quinolonas es debida a mutaciones en la subunidad GyrA (Castro, *et al.* 1997) y en menor grado en la subunidad GyrB de la DNA girasa. La secuenciación del gen *gyrA*, de diversos aislados clínicos resistentes a quinolonas, revelan que presentan mutaciones concretas en la región amino terminal de *gyrA* cerca del residuo Tyr¹²² (región QRDR), el cual es el responsable de la unión covalente de la enzima al DNA (Figura 8) (Fischer, *et al.* 1989; Castro *et al.* 1997; Hooper, 2001).

Entre estas mutaciones, la sustitución en el residuo Ser⁸¹ de la subunidad GyrA de *E. coli* produce una acentuada resistencia a diversas quinolonas (Drlica y Zhao, 1997; Piddock, 2002); estas experiencias nos muestran que la unión del complejo con la enzima mutada es 60 veces inferiores que la unión al complejo con la DNA girasa salvaje. Otras mutaciones en la región QRDR dan lugar a un nivel de resistencia inferior que la debida a cambios en la Ser⁸¹, entre ellas podemos citar mutaciones en los codones 87, 67, 82 y 106, que pueden a la vez coadyuvar a un aumento de la resistencia (Ozeki, *et al.* 1997; Fischer, *et al.* 1989; Ruiz, *et al.* 2002); ello hace inferir que estos residuos también estén implicados en la unión de la quinolona a la DNA girasa (Mason, *et al.* 1995; Drlica y Zhao, 1997). Estos resultados están de acuerdo con el modelo de inhibición de Maxwell mencionado anteriormente.

Estudios posteriores en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* han rebatido la idea de que la DNA girasa sea la única diana principal de las quinolonas, ya que la primera resistencia se debe a mutaciones en la topoisomera IV, mientras que mutaciones en la DNA girasa proporcionan un nivel adicional de resistencia (Drlica y Zhao, 1997). De este modo en *S. aureus*, la topoisomera IV (cuyas subunidades se conocen como GrIA y GrIB) es la primera diana de las quinolonas (Ferrero, *et al.* 1994; Bearden y Danziger, 2001).

Los mayores aportes al respecto han sido efectuados en *Streptococcus pneumoniae*, los cuales también han revelado que la relación entre estructura y actividad de las quinolonas puede ser diferente para cada especie bacteriana (Khouduursky, *et al.* 2000; Hooper, 2001; Taléns-Visconti, *et al.* 2002). Así, de acuerdo al orden mutacional en las QRDR de la DNA girasa y topoisomera IV, los mutantes resistentes de *S. pneumoniae* se pueden agrupar en tres clases. El primer grupo, inicialmente identificado por su resistencia a la ciprofloxacina y también a la levofloxacina, norfloxacina, perfloxacina y trovafloxacina, se caracteriza por presentar mutaciones en la topoisomera IV antes que en la DNA girasa, lo que sugiere que *in vivo*, estos fármacos actúan preferentemente sobre la primera enzima. Un segundo grupo de mutantes, compuesto por resistentes a la esparfloxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina y NSFQ-105 (homólogo a la ciprofloxacina con un grupo 4-4-aminofenilsulfonil-1-piperacino en el C-7), presenta mutaciones en la DNA girasa antes que en la topoisomera IV, lo que señala a aquella como su diana principal. Finalmente, la clinafloxacina y gemifloxacina actúan sobre ambas dianas, la DNA girasa y la topoisomera IV, aunque se generan en primer lugar mutaciones en *gyrA* y *gyrB*, estas mutaciones suceden con bajas frecuencias, lo que indica que ambas contribuyen de forma importante en la acción del fármaco (Taléns-Visconti, *et al.* 2002).

4.2. Alteraciones en la permeabilidad bacteriana

Las quinolonas son moléculas hidrofílicas, que atraviesan la membrana externa de bacterias Gram negativas a través de los canales de porinas. Tanto su tamaño como su topología son compatibles para el ingreso de éstas a través

de las porinas OmpF y OmpC (Giraud, *et al.* 2000). Se ha sugerido que las moléculas más hidrofóbicas podrían estimular por sí mismas su difusión a través de la capa de fosfolípidos, gracias a su capacidad de quelación del magnesio, que se halla en la membrana externa estabilizando el lipopolisacárido (Liu y Ferenci, 1998; Giraud, *et al.* 2000).

Se han descrito numerosos mutantes de permeabilidad que modifican la sensibilidad a quinolonas hidrofílicas, aunque la resistencia de dichos mutantes no es muy elevada. Se reporta que mutaciones en los genes *ompF* y *ompC* dan lugar a una escasa o nula resistencia y éstas se caracterizan por presentar variaciones en las concentraciones de las porinas OmpF y OmpC. Paralelamente, mutaciones en los genes *nfxB*, *norB*, *norC*, *nfxC* y *cfxB* parecen estar asociados a una menor permeabilidad a través de los canales OmpF, así como a una menor permeabilidad a otras moléculas como tetraciclina, cloranfenicol o algunos lactámicos (Wolfson y Hooper, 1989). Por otro lado, mutaciones en los loci *nfx*, *mar*, *cfx* y *sox*, involucrados en la respuesta frente a condiciones medio ambientales adversas, dan lugar a resistencia frente a muchas moléculas diferentes, incluidas las quinolonas. Otras mutaciones, aún no bien caracterizadas genéticamente, se han relacionado de igual modo con bajos niveles de OmpF o de OmpC (Zeller *et al.* 1997).

También se ha postulado que el estado energético de las membranas estaría interviniendo en el transporte de moléculas de quinolonas y por tanto afectando la resistencia. Así pues, la concentración intracelular de norfloxacina es la misma en células salvajes en presencia de desacopladores del transporte electrónico que en mutantes *nfxB*, *cfxB* o *marA* (Cohen, *et al.* 1989).

No existen demasiados resultados concluyentes respecto a las mutaciones que afectan a la membrana externa y se dispone aún de menor información sobre alteraciones en la membrana citoplasmática que pudieran afectar el transporte de dichos compuestos.

4.3. Resistencia por los sistemas de eflujo

Es creciente el interés por los sistemas de eflujo y su relación con la resistencia a antibióticos. Éstos se caracterizan por expulsar al exterior celular un considerable número de moléculas, como antibióticos de distintas familias estructurales y en muchos casos antisépticos, biocidas, compuestos aromáticos y detergentes. Entre sus características está su inespecificidad y su ubicuidad, habiéndose descrito en todas las especies bacterianas analizadas (así como en células eucariotas). Una única célula bacteriana puede tener hasta 20 sistemas de eflujo distintos (Sánchez *et al.* 2003).

Uno de los más conocidos es el sistema de transporte denominado AcrAB de *E. coli*, el cual está codificado en los genes *acrAB* y parece tener como función fisiológica la protección de las células frente a sales biliares y ácidos grasos que son tóxicos habituales de su entorno fisiológico. Este sistema se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y es un proceso inespecífico y dependiente de energía, ligado a un gradiente de protones. El sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplasmática accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima la membrana externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB; bombeando así una gran variedad de sustancias, incluida las quinolonas, presumiblemente a través del canal TolC (Sánchez, 2003).

Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumentan de forma considerable en los mutantes Mar (del inglés "multiple antibiotic resistant"), lo que

implica que dicho locus en *E. coli*, no solo regula la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB. Mutantes Mar presentan resistencias a quinolonas, debido a una disminución en la permeabilidad de la membrana externa y a una importante expulsión activa a través de la membrana interna (Zeller, *et al.* 1997; Giraud, *et al.* 2000; Weber and Piddock, 2001).

4.4. Resistencia mediada por plásmidos

Por el mecanismo de acción de las quinolonas parecía poco probable encontrar mecanismos de resistencia plasmídica a estos antibacterianos. Sin embargo, en 1967, Barbour aisló cepas de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico que presentaban un mecanismo de resistencia codificado en un plásmido. Posteriormente, también se ha descrito este tipo de resistencia en *Shigella dysenteriae* (Munshi *et al.* 1987).

En los últimos años también se ha señalado tal resistencia en cepas de *K. pneumoniae* de origen norteamericano y en cepas de *E. coli* de origen asiático (Martínez, *et al.* 1998). En estas cepas, se ha asociado su resistencia a fluoroquinolonas con la presencia de un plásmido conjugativo, denominado pMG252. Dicho plásmido contiene el gen *qnr*, que codifica la proteína Qnr, capaz de proteger a la DNA girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina. Respecto a la topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece ser que no es afectada por dicha proteína; faltando aún por elucidar como es que interfiere en la unión de la quinolona al DNA girasa (Pascual, 2003).

Las cepas de *E. coli* portadoras de este plásmido son susceptibles a la ciprofloxacina, debido a que el gen *qnr* confiere un bajo nivel de resistencia. Sin embargo, no deja de ser interesante que esta nueva característica coadyuve a la adquisición de mutaciones que confieran resistencia. La demostración *in vitro* de la transmisión de este plásmido por conjugación a otras enterobacterias sugiere un posible riesgo de incremento de resistencia a las fluoroquinolonas en el futuro (Pascual, 2003).

4.5. Mutaciones adaptativas y resistencia

Generalmente se ha asociado la resistencia bacteriana a quinolonas a la selección de mutaciones cromosómicas preexistentes en una población bacteriana dada, denominándose a este tipo de sucesos mutacionales "mutaciones relacionadas con el crecimiento". Junto a ello, cada vez hay más datos sobre otro tipo de sucesos mutacionales que ocurren al exponer las células bacterianas a un proceso selectivo. Este tipo de mutación se denomina "independiente del crecimiento celular" o también "mutación adaptativa".

Las mutaciones adaptativas se caracterizan porque ocurren en células sin dividirse o dividiéndose lentamente y por estar bajo una determinada presión selectiva. Además, parece ser que solo producen fenotipos que favorecen el crecimiento de las células en las condiciones selectivas en que se encuentran (Reisenfeld, *et al.* 1997; Janion 2000). Los mecanismos para explicar las mutaciones adaptativas siguen siendo aún desconocidos. No obstante, se sugiere que el diferente espectro mutacional de células en crecimiento y células sin dividirse (mutaciones adaptativas) son un reflejo de actividades diferenciales de los sistemas de reparación (Reisenfeld, *et al.* 1997; Janion 2000).

Experimentalmente se ha descrito la aparición de mutaciones adaptativas *in vitro*, al tratar *E. coli* con ciprofloxacina. Las primeras colonias de mutantes espontáneos en aparecer son probablemente el resultado de mutaciones preexistentes en la población inicial, mientras que las colonias de mutantes que van

apareciendo desde unos pocos días hasta aproximadamente un mes de incubación, serían consecuencia de mutaciones adaptativas (Reisenfeld, *et al.* 1997).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, V.; Herrera, G.; Urios, A. and M. Blanco. 1991. Effects of Ciprofloxacin on Plasmid DNA Supercoiling of *Escherichia coli* Topoisomerase I Gyrase Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Jun. Vol.35, N°1: 20-23.
- Beardem D. and I. Danzinger. 2001. Mechanism of Action of and Resistance to Quinolones. *Pharmacotherapy*. Oct.21: 224S-232S.
- Castro, D.; Ruiz, J.; Santamaría, J.; Vila, J. y J. Borego. 1997. Mecanismos de Resistencia Quinolonas en cepas de *Salmonella typhimurium* strains. *Ars. Pharmaceutica*. N°38. 63-69.
- Chu, D. and P. Fernandes. 1989. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb: 131-135
- Clerch, B. 1991. Papel del sistema SOS y del Mecanismo de Reparación por Escisión en la Mutagénesis producida por Fluoroquinolonas. *Trabajo Experimental en el Programa de Microbiología Básica. Univ. Autónoma de Barcelona.*: 101 pp.
- Clerch, B.; Barbe, J. and M. Llagostera. 1992. The role of the excision and error-prone repair systems in mutagenesis by fluorinated quinolones in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 281: 207-213.
- Clerch, B. 1995. Estudio de la Mutagénesis Inducida por Quinolonas en *Salmonella typhimurium* y de los Mecanismos de Resistencia de *Escherichia coli* a Estos Antimicrobianos. *Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.*
- Clerch, B.; Bravo, J.M. and M. Llagostera. 1996a. Analysis of the Ciprofloxacin Induced Mutations in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Mutagenesis* 27: 110-115.
- Clerch, B.; Bravo, J.M. and M. Llagostera. 1996b. Efficiency of MucAB and *Escherichia coli* UmuDC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*; effect of MucA and UmuD processing. *Mutation Research*. 349: 201-208.
- Clerch, B.; Rivera, E. and M. Llagostera. 1996c. Identification of a pKM101 Región Which Confers a Slow Growth Rate and Interferes with Susceptibility to Quinolone in *Escherichia coli* AB1157. *Journal of Bacteriology*. Oct.: 5568-5572.
- Cohen, S.; McMurry, L.; Hooper, D.; Wolfson, J. and S. Levy. 1989. Cross Resistance to fluorquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline and chloramphenicol decreased drugs accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 33: 1318-1325.
- Cohen-Fix, O. and Z. Livneh. 1992. Biochemical analysis of UV mutagenesis in *Escherichia coli* by using a cell-free reaction coupled to a bioassay: Identification of a DNA repair-dependent, replication-independent pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. Vol.80: 3300-3304.
- Cohen, O. and Z. Livneth. 1994. *In Vitro* UV Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision-Repair Gaps in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.269, N°7: 4953-4958.
- Drlica, K. and X. Zhao. 1997. Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Sept. Vol.61, N°3: 377-392.
- Ferrero, L.; Cameron, B. and B. Manse. 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV. A Primary Target of Fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641653.
- Fisher, L.; Lawrence, J.; Josty, I.; Hopewell, R.; Margerrison, E. and M. Cullen. 1989. Ciprofloxacin and the fluorquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am. J. Med. Nov.* 30: 87(5A): 2S-8S.
- Friedberg, E.; Walker, G. and W. Siede. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press. Washington D.C.
- García-Rodríguez y Muñoz-Bellido. 2003. ¿Qué nuevas Quinolonas podemos Esperar?. Symposium 3. Rev. Española de Quimioterapia. Vol.16 (Sup.1).
- Giraud, E.; Cloeckert, A.; Kerboep, D. and E. Chaslus-Dancla. 2000. Evidence for Active Efflux as the Primary Mechanism of Resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. May. Vol.44, N°5: 1223-1228.
- Hallet, P. and A. Maxwell. 1991. Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. *Antimicrobial Agents Chemother.* 35: 335-340.
- Hooper, D. and J. Wolfson. 1993. Mechanism of Bacterial resistance to quinolone. In Hooper D.C. y Wolfson, J.S. (eds.). *Quinolone Antimicrobial Agents*, pp.97-118. ASM. Washington D.C.
- Hooper, D. 1995. Quinolone mode of action. *Drugs*. 49 (Suppl.2): 1015.
- Hooper, D. 2001. Mechanism of Action of Antimicrobial: Focus on Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 32: S9-S15.
- Janion, C. 2001. Some aspects of the SOS response system A critical survey. *Acta Biochimica Polonica*. Vol.48, N°3: 599610.
- Khodursky, A. and N. Cozzarell. 1998. The Mechanism of Inhibition of Topoisomerase IV by Quinolone Antibacterials. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.273, N°42: 27668-27677.
- King, D.; Malone, R. and S. Lilley. 2000. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American Family Physician*. May.2-12.
- Kojima, M. 1997. Mechanism for the development of quinolone resistance. *Nippon Rinsho*. May.55(5): 1252-1260.

28. Liu, X. and T. Ferenci. 1998. Regulation of Porin-Mediated Outer Membrane Permeability by Nutrient Limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Aug. Vol.180, N°15: 3917-3922.
29. Mason, D.; Power, G.; Talsania, H.; Philips, I. and V. Gant. 1995. Antibacterial Action of Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Dec. Vol.39, N°12: 2752-2758.
30. Munshi, M.; Sack, D.; Haider, K.; Ahmed, Z.; Rahaman, M. and M. Morshed. 1987. Plasmid mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type I. *Lancet*. 22;2: 419-422.
31. Muñoz-Najar, U. and M.N. Vijayakumar. 1999. An operon that confers UV resistance by evoking the SOS mutagenic response in Streptococcal conjugative transposon Tn5252. *Journal of Bacteriology*, 181: 2782-2788.
32. Ozeki, Sh.; Deguchi, T.; Yasuda, M.; Nakano, M.; Kawamura, T.; Nishino, Y. and Y. Kawada. 1997. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* Mutations in *Escherichia coli* and determination of Incidence of *gyrA* Mutations in Clinical Strains Isolated Patients with Complicated Urinary tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. Sep. Vol.35, N°9: 2315-2319.
33. Palumbo, M.; Gatto, B.; Zagotto, G. and Palú, 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends in Microbiol.* 1.232-235.
34. Piddock, L. and R. Wise. 1987. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiology Letters*, 41: 289-294.
35. Piddock, L.; Walters, R. and T. Diver. 1990. Correlation of quinolone MIC and Inhibition of DNA, RNA, and Protein Synthesis and Induction of the SOS Response in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Dec.: 2331-2336.
36. Piddock, L. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 3-16.
37. Reece, R. and A. Maxwell. 1991. DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 26(3/4): 335-375.
38. Riesenfeld, C.; Everett, M.; Piddock, L. and B. Hall. 1997. Adaptive Mutations Produce Resistance to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. Sept. Vol.41, N°9: 2059-2060.
39. Ruiz, J.; Gómez, J.; Navia, M.; Ribera, A.; Sierra, J.; Marco, F.; Mensa, J. and J. Vila. 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 42: 257-261.
40. Ruiz-Laguna, J. and C. Pueyo. 1999. Hydrogen Peroxide and coffee induce G:C->T:A transversions in the *lacI* gene of catalase-defective *Escherichia coli*. *Mutagenesis*. Vol.14, N°1: 95-102.
41. Sánchez Diaz, P. 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Revis. Española de Quimioterapia*. Vol.16(N°2): 172-187.
42. Shen, L. 1993. Quinolone-DNA Interaction. *Quinolone Antimicrobial Agents*. 2^{da} Edic. 77-95.
43. Taléns-Visconti, R.; Garrigues, T. y E. Cantón. 2002. Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismos de acción y Resistencia. *Rev. Exp. Quimioterapia*. Vol.15, N°4: 313-324.
44. Taléns-Visconti, R. 2001. Actividad Antimicrobiana *in vitro* de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura-actividad. *Tesis Doctoral-Universidad de Valencia*. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
45. Vila, J.; Ribera, A.; Marco, F.; Ruiz, J.; Mensa, J.; Chávez, J.; Hernandez, G. and T. Jimenez de Anta. 2002a. Activity of Ciprofloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 471-477.
46. Weber, M. and L. Piddock. 2001. Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. May. Vol.45, N°5: 1550-1552.
47. Wolfson, J. and D. Hooper. 1989. Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Oct. Vol.2, N°4: 378-224.
48. Yamada, M.; Sofuni, T. and T. Nohmi. 1992. Preferential induction of AT-TA transversion, but not deletions, by chlorambucil at the *hisG428* site of *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*. 283: 29-33.
49. Yoshida, H.; Nakamura, M.; Bogaki, M.; Ito, H.; Kojima, T.; Hattori, H. and Sh. Nakamura. 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Ap. Vol.37, N°4: 839-845.
50. Zeller, V.; Janoir, C.; Kitzis, M.; Gutmann, L. and N. Moreu. 1997. Active Efflux as a Mechanism of Resistance to Ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sept. Vol-41, N°9: 1973-1978.
51. Zhao, X.; Xu, Ch.; Domagala, J. and K. Drlica. 1997. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.94: 13991-13996.
52. Zhao, X. and K. Drlica. 2002. Restricting the selection of Antibiotic-Resistant Mutant Bacteria: Measurement and potential Use of the Mutant Selection Window. *The Journal of Infectious Diseases*. 185: 561-565.

TABLA 1.- CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS.

Clasificación	Quinolonas (Año de aparición)	Espectro antimicrobiano	Características clínicas
Primera Generación	Ácido Nalidíxico (1962) Cinoxacina Ácido oxolinico Ác. pipemídico (1973) Rosoxacina Flumequina	Organismos Gram negativos (excepto especies de <i>Pseudomonas</i>).	Infecciones no complicadas del tracto urinario.
Segunda Generación	Norfloxacina (1978) Ciprofloxacina (1987) Ofloxacina (1991) Enoxacina (1992) Pefloxacina Lomefloxacina (1992) Enrofloxacina (uso exclusivo en veterinaria) Fleroxacina	Organismos Gram negativos (incluyendo especies de <i>Pseudomonas</i>), algunos organismos Gram positivos (incluyendo <i>Staphylococcus aureus</i> , pero no <i>Streptococcus pneumoniae</i>) y patógenos atípicos.	Infecciones complicadas y no complicadas del tracto urinario, y otras como pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, prostatitis, infecciones de la piel, gastroenteritis y diarrea severa, infecciones nosocomiales.
Tercera Generación	Levofloxacina (1997) Esfarfoxacina (1997) Grepafloxacina (1998) Gatifloxacina (1999) Moxifloxacina (1999)	Igual que para las quinolonas de segunda generación, pero con más actividad frente a Gram positivos (<i>S. pneumoniae</i> sensible y resistente a penicilina), y frente a patógenos atípicos.	Igual que las de segunda generación, pero además en casos de bronquitis crónica, neumonías intra hospitalarias, neumonías atípicas adquirida en la comunidad de pacientes hospitalizados.
Cuarta Generación	Clinifloxacina Difloxacina Tosufloxacina Trovafoxacina (1999) Sitafloxacina Gemifloxacina	Igual que para las quinolonas de tercera generación, pero con actividad frente a anaerobios.	Igual que las de primera, segunda y tercera generación, en infecciones complicadas del tracto urinario y casos de pielonefritis, infecciones intraabdominales, neumonías nosocomiales e infecciones pélvicas.

(tomado y modificado de King et al. 2000).

TABLA 2.- ACTIVIDADES CELULARES RELACIONADAS CON LA DNA GIRASA

ACTIVIDADES CELULARES EN LA QUE ESTÁ INVOLUCRADA LA DNA GIRASA
Introducción de superenrollamientos negativos en el DNA. Inicio y elongación de la replicación y posiblemente en la terminación. Segregación de los cromosomas replicados. Resolución de estructuras intermedias de DNA entrelazadas durante el proceso de recombinación. Participación en el proceso de transcripción y regulación de promotores dependientes del superenrollamiento del DNA. Participación en procesos de integración fágica y en transposición de algunos transposones como el Tn5

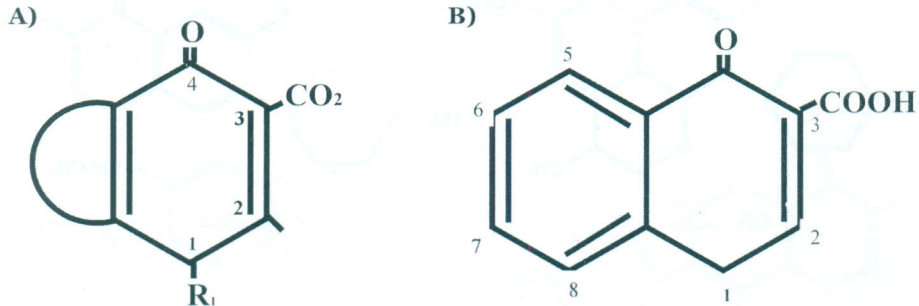


Figura 1.- Estructura molecular básica de las quinolonas. **A)** Estructura del anillo de piridona. **B)** Estructura del anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína.

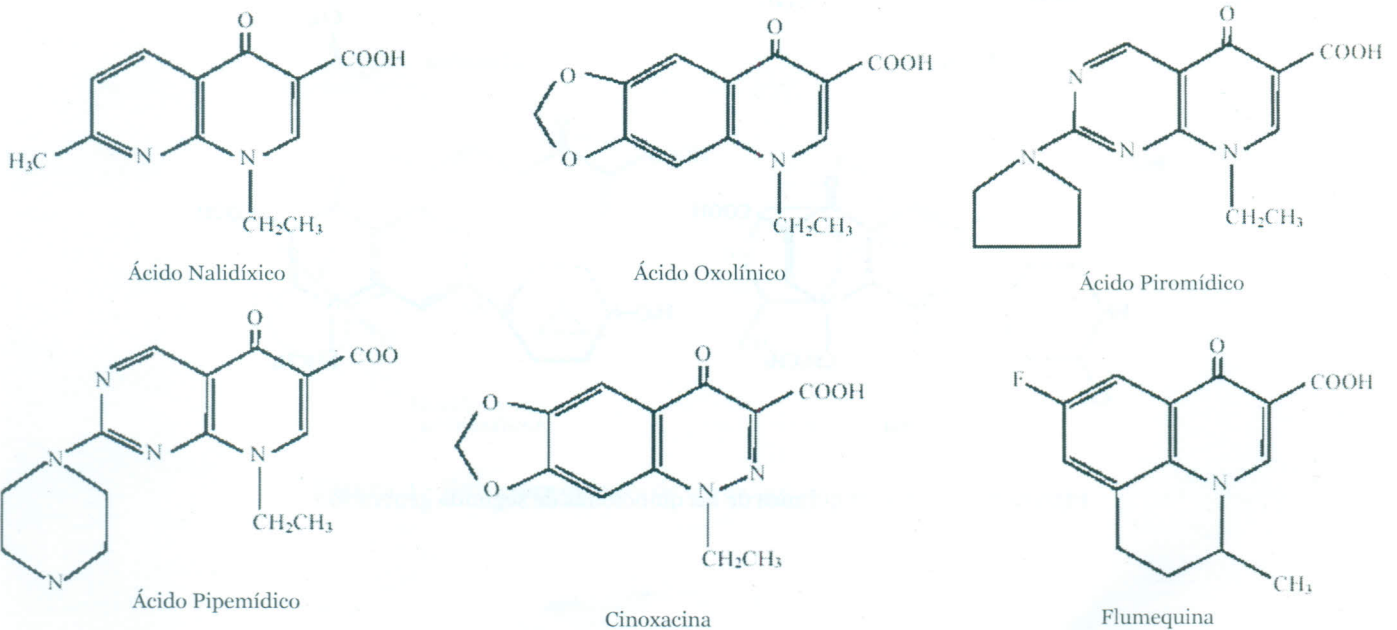


Figura 2.- Estructura química de las quinolonas de primera generación.

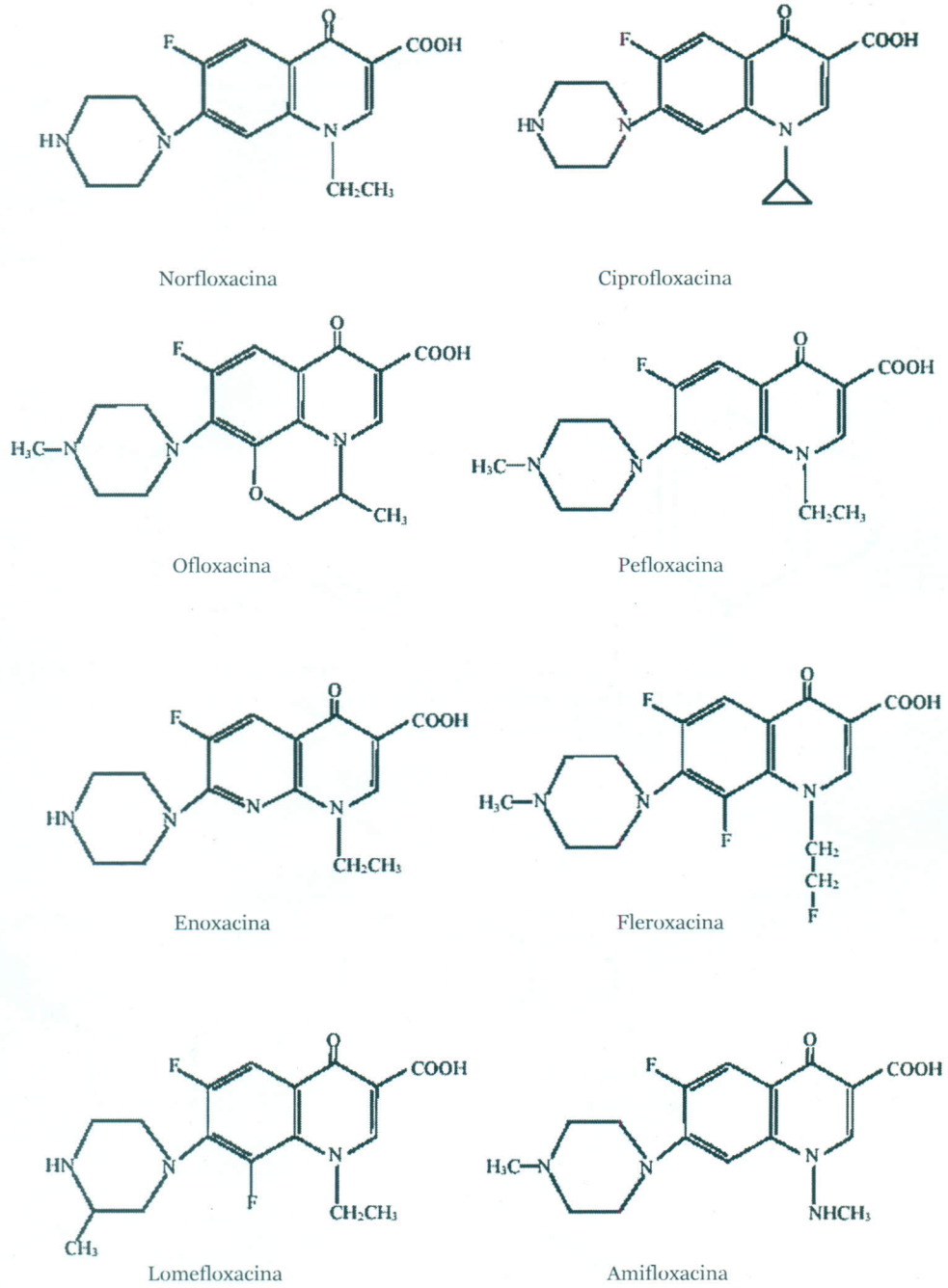
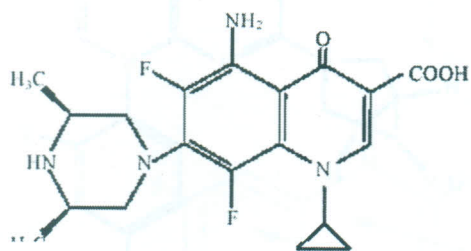
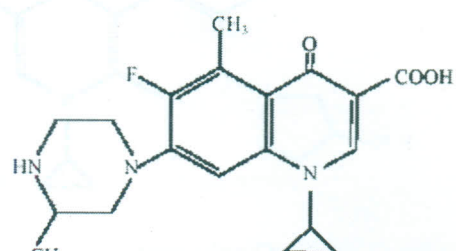


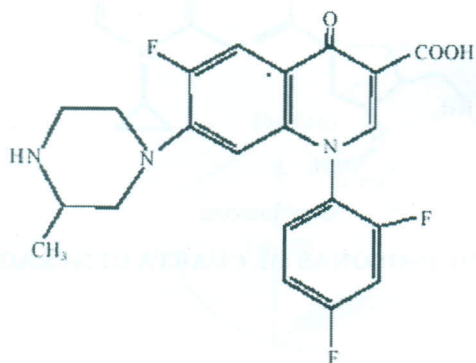
Figura 3.- Estructura química de las quinolonas de segunda generación.



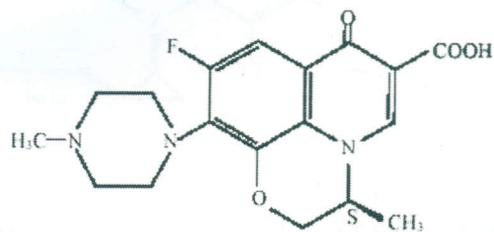
Enoxifloxacina



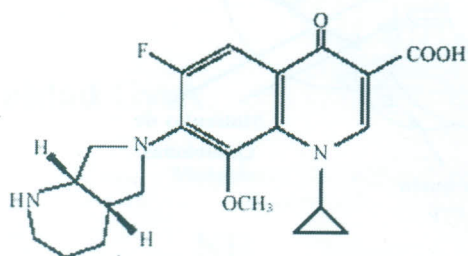
Grepafloxacina



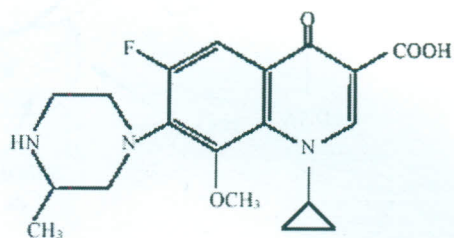
Temafloxacina



Levofloxacina



Moxifloxacina



Gatifloxacina

Figura 4.- Estructura química de las quinolonas de tercera generación.

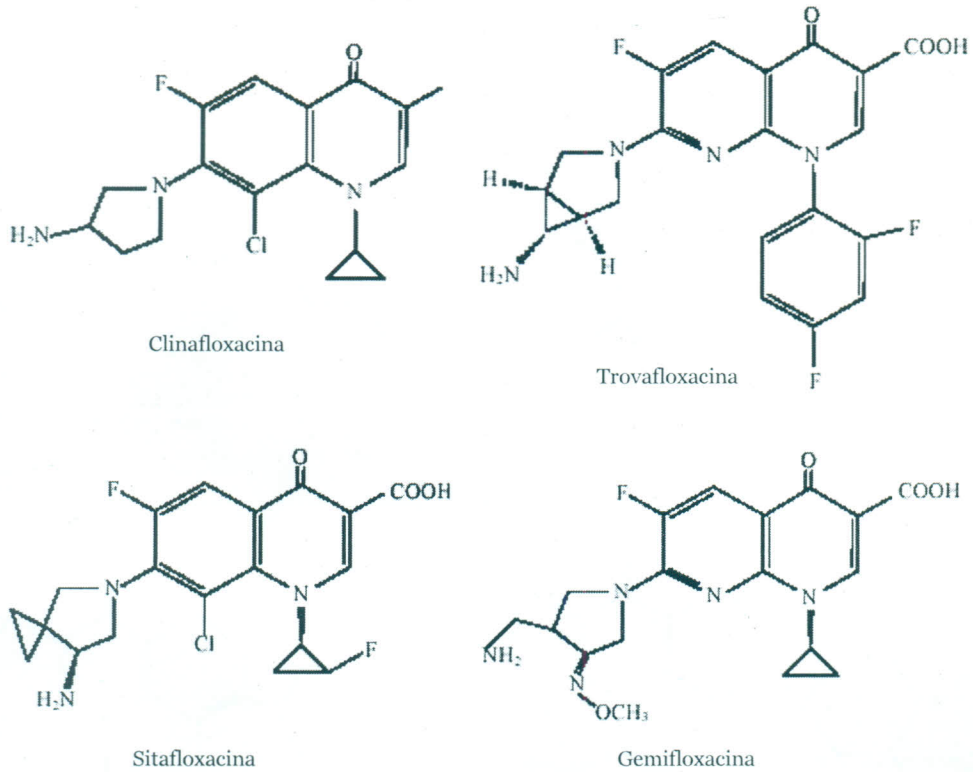


FIGURA 5.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN.

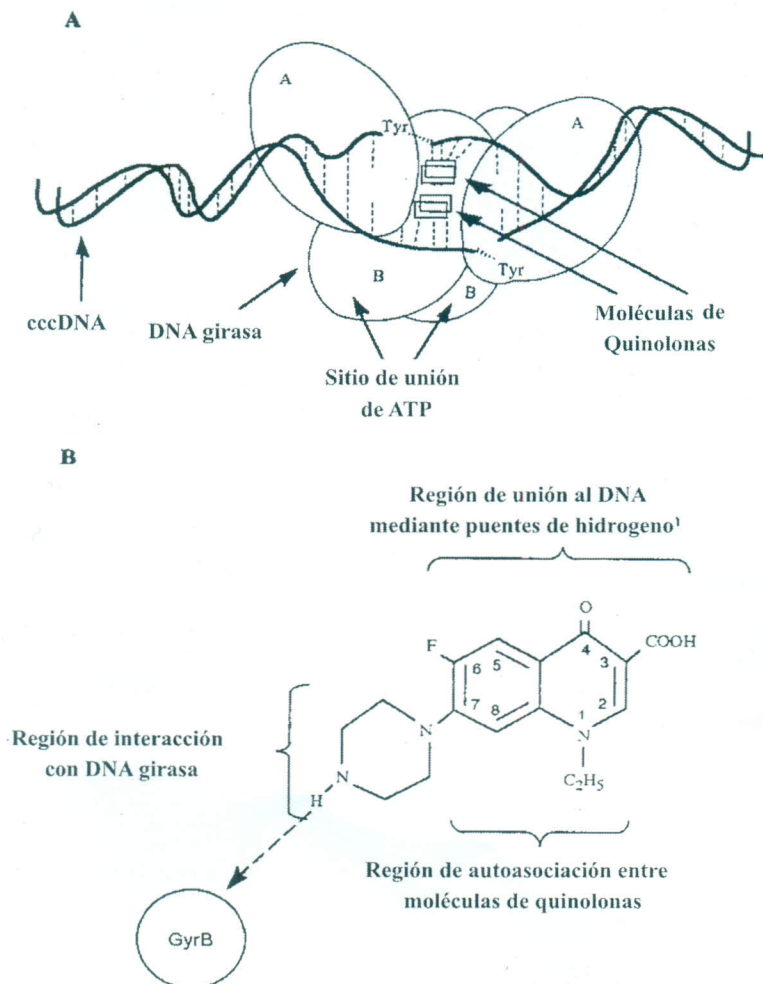


FIGURA 6.- A) MODELO DE UNIÓN COOPERATIVA PROPUESTO POR SHEN Y COL. PARA LA INHIBICIÓN DE LA DNA GIRASA. B) DOMINIOS FUNCIONALES QUE SE CREARÍAN EN EL MODELO PROPUESTO.

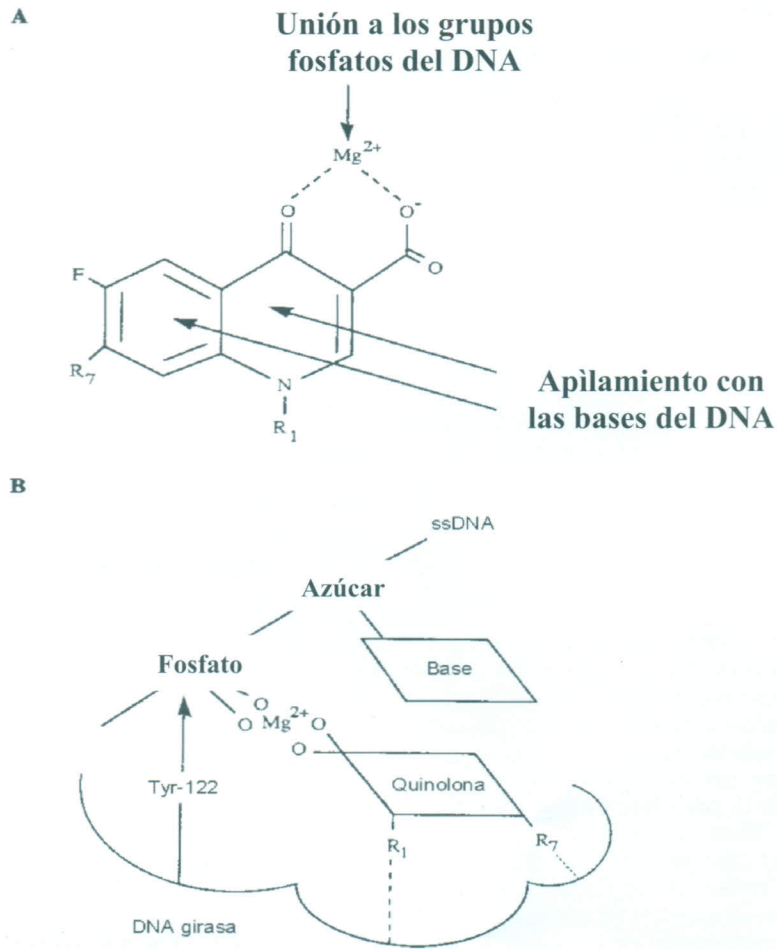
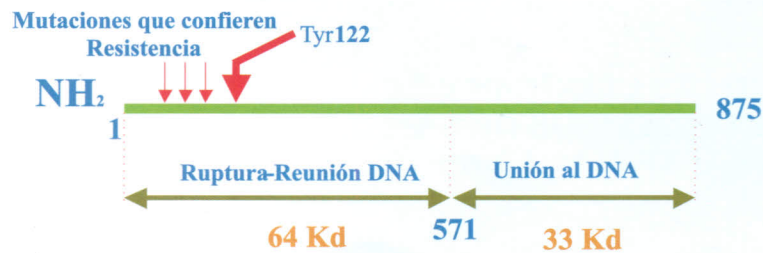


FIGURA 7.- MODELO REVISADO DE LA UNIÓN QUINOLONA - DNA. A) INTERACCIÓN QUINOLONA - DNA A TRAVÉS DE IONES Mg^{2+} . B) MODELO MOLECULAR DE INTERACCIÓN DE QUINOLONA CON UNA REGIÓN ssDNA EN EL COMPLEJO DNA GIRASADNA (MODIFICADO DE PALUMBO, *et al.* 1993).

Unidad GyrA



Unidad GyrB



FIGURA 8.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LAS SUBUNIDADES GyrA y GyrB DE LA DNA GIRASA DE *E. coli*, MOSTRANDO LAS REGIONES INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A QUINOLONAS.